

**DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA
E TOSSICOLOGIA
XIX CICLO**

RUOLO DEI GENI NOTCH NELL'EPATOCARCINOMA UMANO

Presentata da

Dott.ssa Catia Giovannini

Relatore

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli Forti

Correlatore

Dr. Pasquale Chieco

A.A 2005-2006

INDICE

PARTE GENERALE	5
INTRODUZIONE	6
<u>FEGATO</u>	7
FUNZIONI DEL FEGATO	8
<u>PATOLOGIE EPATICHE</u>	10
CIRROSI	10
EPATOCARCINOMA	12
<u>CAUSE DELL'EPATOCARCINOMA</u> <u>PRIMITIVO</u>	13
VIRUS DELLE EPATITI	13
AFLATOSSINE E ALTRI CANCEROGENI	15
<u>TRATTAMENTO DELL'EPATOCARCINOMA</u>	17
CHIRURGIA	17
TRAPIANTO DI FEGATO	17
CHEMIOEMBOLIZZAZIONE	17
ALCOLIZZAZIONE E TERMOABLAZIONE	18
ANTRACICLINE	19
MARCATORI BIOLOGICI DELL'EPATOCARCINOMA	22
<u>I GENI NOTCH</u>	23
ATTIVAZIONE DEI RECETTORI NOTCH	24

I GENI NOTCH NEI TUMORI UMANI.....	25
NOTCH3 E CADASIL.....	27
NOTCH3 E TUMORI UMANI.....	28
<u>RNA INTERFERENCE</u>	29
MECCANISMO BASE DELL'RNAi.....	31
RNAi IN CELLULE DI MAMMIFERO.....	32
PROGETTARE I siRNA.....	33
<u>SCOPO DELLA TESI</u>	34
 PARTE SPERIMENTALE	36
CASISTICA.....	37
IMMUNOISTOCHEMICA.....	37
COLTURE CELLULARI.....	39
RNA INTERFERENCE.....	39
ANALISI DEL CICLO CELLULARE.....	40
TRATTAMENTO CON DOXORUBICINA.....	41
RT-PCR.....	41
ESTRAZIONE PROTEICA.....	42
WESTERN BLOT.....	42
COMET ASSAY.....	44
ANALISI STATISTICA.....	45
 <u>RISULTATI</u>	46

<u>DISCUSSIONE</u>	51
---------------------------------	----

<u>APPENDICE</u>	54
-------------------------------	----

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	60
----------------------------------	----

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

L'epatocarcinoma (HCC) è una neoplasia molto diffusa la cui incidenza è in continuo aumento. L'epatocarcinoma è una neoplasia resistente alle terapie oggi disponibili nonostante molti studi siano stati fatti per superare la chemioresistenza.

I recettori Notch sono coinvolti nella proliferazione nel differenziamento e nell'apoptosi. Molti studi riportano alterazioni del Notch signaling pathway nelle neoplasie umane suggerendo che tali recettori potrebbero essere considerati buoni targets terapeutici per uccidere le cellule maligne. In questo studio abbiamo valutato l'espressione dei recettori Notch1, 3 e 4 in 20 campioni di HCC e tessuto circostante. L'analisi immunoistochimica ha mostrato una iper-espressione del Notch3 nel 75% degli HCC analizzati mentre il tessuto circostante la neoplasia è risultato negativo in tutti i casi. Al contrario Notch1 e Notch4 risultavano espressi allo stesso modo sia nell'epatocarcinoma che nei tessuti liberi da neoplasia. Per capire le funzioni del recettore Notch3 nell'epatocarcinoma abbiamo analizzato le conseguenze della down-regolazione di Notch3 mediante infezione con shRNA nella linea tumorale epatica HepG2. La riduzione dei livelli di Notch3 causava un aumento dei livelli di p53, p-p53, p27 e Gadd45a ma diminuiva i livelli di p21 e HES1, quest'ultimo target specifico di NICD (Notch intracellular domain). L'apoptosi indotta dal trattamento con doxorubicina aumentava di tre volte nelle cellule Notch3 KO (Knock out). Il silenziamento simultaneo di Notch3 e p53 diminuiva la morte

cellulare indotta da doxorubicina rispetto al solo silenziamento di Notch3. I risultati ottenuti indicano che il silenziamento di Notch3 potrebbe rappresentare una nuova strategia per aumentare l'effetto tossico della doxorubicina nel trattamento dell'epatocarcinoma.

FEGATO

Il fegato è una voluminosa ghiandola localizzata nell'ipocondrio destro. E' l'organo più voluminoso del corpo umano. La struttura interna è lobulare; il parenchima è infatti costituito da un gran numero di unità elementari, i lobuli, tutte uguali e dotate di autonoma funzione. Negli spazi interlobulari, detti anche portalì, decorrono le ultime ramificazioni della vena porta, attraverso le quali giunge al lobulo il sangue proveniente dall'intestino, carico di sostanze assorbite nel corso della digestione. Nell'asse del lobulo scorre invece la vena centrolobulare, che rappresenta l'origine del cosiddetto circolo del fégato o circolo portale, cioè delle vene sovraepatiche tributarie della vena cava inferiore. Tra la vena centrolobulare e la periferia del lobulo le cellule epatiche sono ordinate in colonne disposte radialmente, che lasciano tra di loro degli spazi (sinusoidi) attraverso i quali il sangue proveniente dalle vene interlobulari raggiunge la vena centrolobulare. Il sangue scorre direttamente a contatto con le cellule epatiche poiché manca nei sinusoidi un vero e proprio endotelio. Sono presenti solo cellule, dette di Kupffer, la cui funzione è legata alla sintesi della bilirubina dall'emoglobina. Nelle colonne di cellule epatiche del lobulo

decorrono pure i capillari biliari, che confluiscono alla periferia del lobulo dando vita ai dotti biliari. Questi a loro volta, all'altezza dell'ilo del fegato, si fondono in un unico dotto (dotto epatico), che con il condotto cistico, proveniente dalla colecisti, viene a costituire il coledoco che porta la bile al duodeno. Oltre ai vasi sanguiferi, dal fegato partono vasi linfatici, distinti in profondi, che si originano dai lobuli, e superficiali, che formano una fitta rete sotto la membrana sierosa. I nervi del fegato derivano dal plesso celiaco e dal vago e formano, lungo l'arteria epatica e i suoi rami, il plesso epatico.



Colorazione tricromia di uno spazio portale

Funzioni del fegato

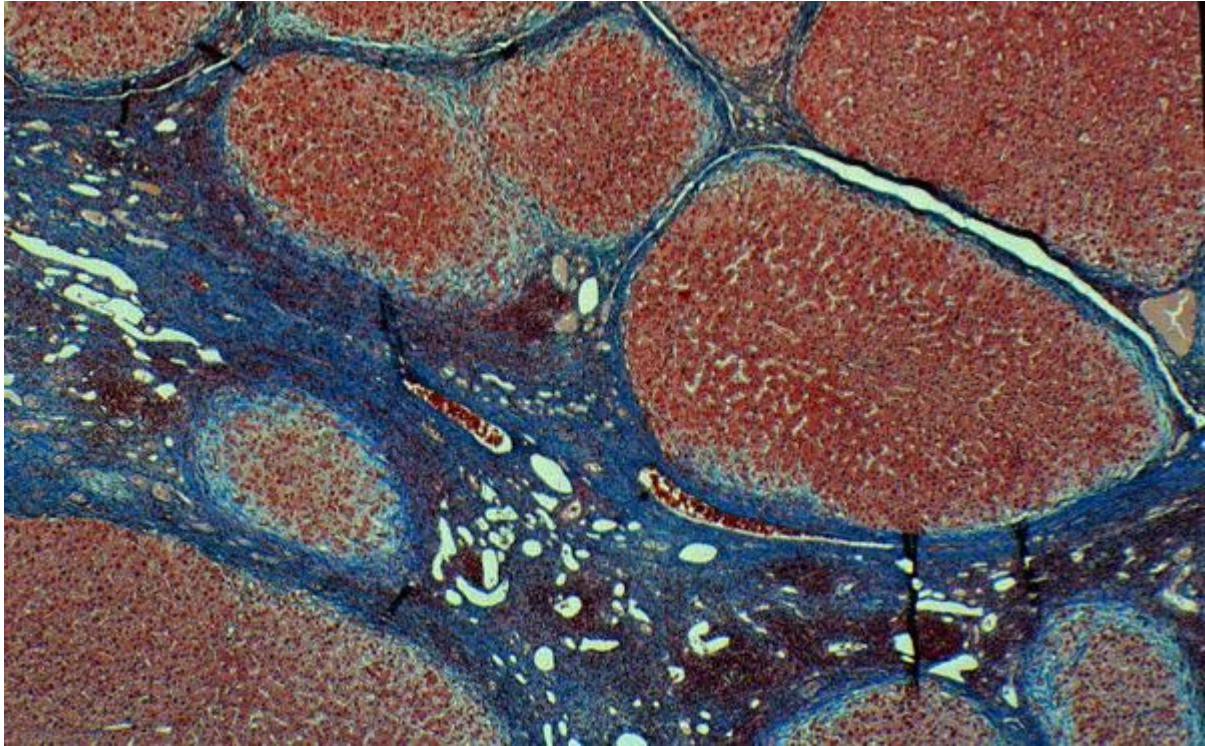
Il fegato è deputato alla produzione dei sali e dei pigmenti biliari e alla secrezione della bile nell'intestino, fondamentale per la digestione; svolge importanti funzioni nel metabolismo glicidico, lipidico e proteico. Il 6-7% in peso del fegato è costituito da glicogeno che, allorché i tessuti si impoveriscono

di materiali necessari per la produzione di energia, viene trasformato in unità di glucosio prontamente utilizzabili a scopo energetico. In circostanze particolari (per esempio, digiuno, diabete, strapazzi fisici ecc.) il fégato cerca di fornire ugualmente glucosio ai tessuti operandone la sintesi *ex novo* a partire dagli aminoacidi (gluconeogenesi). Nell'ambito del metabolismo lipidico il fégato ha un ruolo preminente nei processi di mobilitazione, trasporto e utilizzazione dei grassi. Tra le numerose attività del fégato connesse con il metabolismo proteico rivestono importanza particolare i processi di transaminazione e di deaminazione degli aminoacidi e la sintesi dell'urea. Il fegato sintetizza il fibrinogeno, le albumine del plasma, la transferrina, la ceruloplasmina, i fattori VII, IX e XI della coagulazione, la protrombina e numerose altre sostanze proteiche. Interposto tra il circolo portale e quello generale, fa da filtro per le sostanze che vengono assorbite dall'intestino, svolgendo anche importanti funzioni disintossicanti, sia per mezzo di sistemi enzimatici, sia mediante assorbimento o fissazione dei composti chimici circolanti nel sangue, successivamente eliminati nell'intestino con la bile. Va anche accennata la funzione di immagazzinamento del ferro e di numerose vitamine (A, D, K, E, vitamine del complesso B e la vitamina B12 in particolare).

PATOLOGIE EPATICHE

Cirrosi

La cirrosi è una affezione del fegato caratterizzata da un aumento del tessuto connettivo dell'organo (sclerosi) e dalla presenza di zone nodulari di rigenerazione degli epatociti. A questa situazione si arriva attraverso alcune tappe che si ripetono con una certa regolarità. In seguito all'azione dei cosiddetti fattori cirrogeni (che determinano la cirrosi), diversi e spesso malconosciuti, il tessuto epatico subisce un danno che va dalla degenerazione (più frequentemente steatosi) alla necrosi. La morte delle cellule stimola un tipo di elementi, chiamati fibroblasti, presenti nel fegato, a proliferare e a produrre in grande quantità tessuto connettivo collagene, il tessuto caratteristico della cicatrizzazione. Probabilmente però i fibroblasti vengono stimolati anche prima dagli stessi fattori cirrogeni che provocano la morte delle cellule. Così i lobuli, che costituiscono l'elemento architettonico del fegato, sono circondati e come strozzati da questi tralci connettivali di nuova formazione. In tal modo molte altre cellule muoiono. e parallelamente si assiste a una proliferazione ulteriore di fibroblasti: di conseguenza gli epatociti rimasti cominciano a proliferare nell'intento di riparare il danno e danno vita a nuovi lobuli, detti anche pseudolobuli che tuttavia risultano ben diversi dai lobuli normali, con architettura sovvertita e privi delle consuete connessioni vascolari; ad esempio è ben difficile osservare la piccola vena centrolobulare.



Colorazione tricromia di cirrosi epatica

Altra manifestazione tipica della cirrosi è l'ascite, cioè l'accumulo di un liquido povero di proteine (trasudato) in cavità peritoneale, che arriva a far assumere all'addome un aspetto globoso, molto voluminoso, e ha la caratteristica di riformarsi quando il liquido venga estratto con la paracentesi. Nel determinismo dell'ascite entrano in gioco meccanismi complessi anzitutto l'ipertensione portale provoca una fuoriuscita di liquido dai vasi capillari della vena porta e soprattutto da quelli localizzati in corrispondenza del peritoneo e della capsula del fegato: inoltre, poiché a causa della funzionalità compromessa dell'organo vengono

sintetizzate meno proteine (albumine e globuline), si verificherà una diminuzione anche delle proteine plasmatiche (ipoproteinemia). Siccome una delle funzioni di queste proteine è quella di richiamare acqua dall'interstizio e di opporsi alla sua fuoriuscita a livello del letto capillare, una loro diminuzione porterà fatalmente all'aumento della quantità di liquido che si accumula al di fuori dei vasi.

Epatocarcinoma (HCC)

I tumori maligni del fegato comprendono l'epatocarcinoma, la neoplasia di gran lunga più frequente, il colangiocarcinoma e l'angiosarcoma e rappresentano, a livello mondiale, una delle maggiori cause di morte per tumore (Suriawinata AA, 2002). Più del 70% degli oltre un milione di nuovi casi per anno nel mondo si verificano nei Paesi in via di sviluppo, nei Paesi del Sud-Est Asiatico, nelle regioni del Pacifico occidentale, del Sahara e dell'Africa meridionale. L'Italia occupa una posizione intermedia per tassi di incidenza e mortalità e l'epatocarcinoma rappresenta la settima causa di morte per tumore, con circa 5.000 decessi, ossia circa il 3% delle morti per tumore.

CAUSE DELL'EPATOCARCINOMA PRIMITIVO

I virus dell'epatite

L'infezione cronica da HBV è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di epatocarcinoma (HCC). Su scala mondiale, si stima un'incidenza tra 500.000 e 1.000.000 di casi di HCC l'anno, di cui oltre il 50% associati anche ad infezione HBV (Lupberger J, 2007; Feitelson MA, 2006). Il coinvolgimento dell'HBV nell'induzione di HCC è sostenuto da studi epidemiologici e virologici nonché dall'evidenza che virus strettamente correlati all'HBV (WHV, GSHV) inducono carcinoma epatico nel loro ospite naturale. Gli studi epidemiologici hanno mostrato che in caso di infezione cronica HBV il rischio di HCC è almeno 100 volte superiore che in assenza di infezione. Lo sviluppo di HCC è un processo multistep a lenta evoluzione: la neoplasia compare dopo un periodo di 15-30 anni di infezione cronica, generalmente, ma non necessariamente, in fegati cirrotici, evidenziando l'importanza di meccanismi in cui il virus ha un ruolo indiretto, quale agente promotore di infiammazione cronica immuno-mediata e rigenerazione epatica. Tuttavia molteplici evidenze sperimentali hanno portato all'opinione che anche meccanismi diretti contribuiscano al processo di carcinogenesi epatica da HBV.

A sostegno dell'importanza di tali meccanismi (azione di proteine virali e integrazione di DNA virale nel genoma cellulare) c'è l'evidenza di casi di HCC

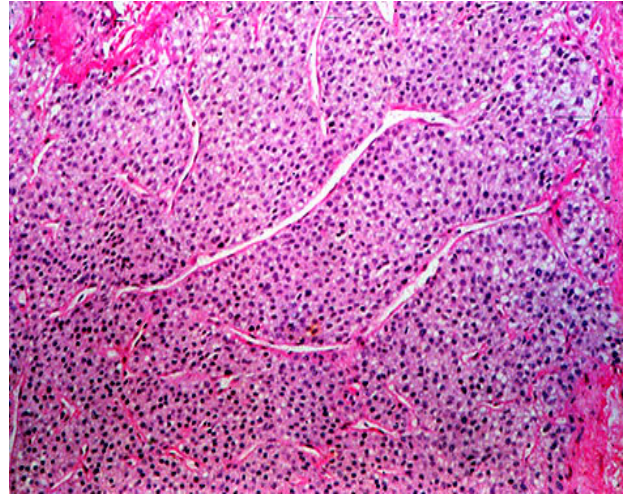
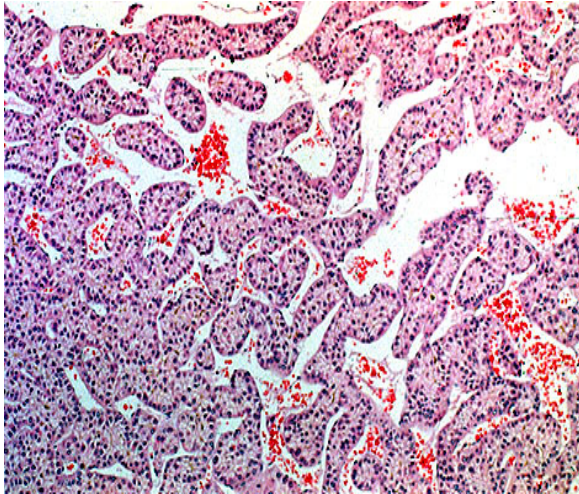
indotto in presenza di infezione da HBV e sviluppatosi in assenza di infiammazione epatica e cirrosi. Per quanto riguarda l'integrazione di HBV, nel passato l'apparente assenza di siti ricorrenti e il raro rilevamento di geni presso il sito d'inserzione hanno portato al concetto di mutagenesi inserzionale come meccanismo raro nella carcinogenesi epatica da HBV. Tale concetto è stato recentemente rivisto, poiché è stato accertato che geni cellulari sono presenti presso il sito d'integrazione di HBV in circa il 70% di HCCs e che siti ricorrenti d'integrazione esistono anche per HBV.

Gli studi epidemiologici sull'associazione tra infezione da virus dell'epatite C e sviluppo di HCC sono iniziati in rapida successione dopo la messa a punto del primo saggio di rilevamento anticorpale specifico. L'infezione da HCV è stata dimostrata fattore di rischio indipendente anche da quella da HBV (Michielsen PP, 2005). I possibili meccanismi di induzione di HCC da parte del virus HCV sono tuttavia poco noti trattandosi di un virus ad RNA nel cui ciclo replicativo, che avviene nel citoplasma, non è presente una fase a DNA né è nota la possibilità della presenza di integrazioni virali o di oncogeni virali. Si ritiene che un ruolo importante sia dato dalla persistenza virale per lo stimolo immunitario incessante che esercita. Ulteriori ipotesi sono relative ad un possibile ruolo indiretto di alcune proteine virali, in particolare la proteina core e l'NS5. La proteina core di HCV interagisce con diverse vie di trasduzione dei segnali intracellulari (TNF- α , NF-kB, attivazione della via indotta da

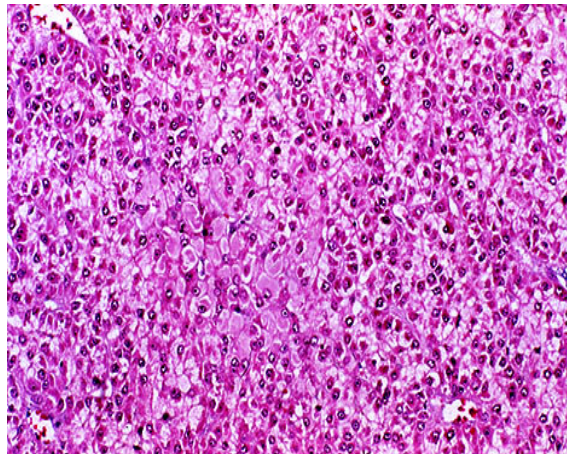
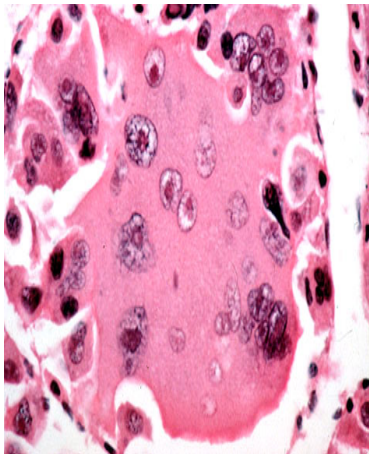
stress ossidativi: kinasi MAPK, JNK/SAPK); inibisce e induce l'apoptosi Fas- e TNF- α mediata contribuendo in tal modo ad una aumentata sopravvivenza o ad un incremento della proliferazione degli epatociti (Saito K, 2006). Inoltre influenza la risposta immunitaria, riducendo ad esempio la capacità di risposta degli epatociti al TNF- α . Un ruolo diretto nell'induzione di HCC è stato evidenziato in topi transgenici per l'espressione di core in cui viene accelerata l'induzione di carcinoma epatico. La proteina non strutturale NS5a conferisce resistenza all'interferone contribuendo alla persistenza dell'infezione.

Aflatossina ed altri cancerogeni nella dieta

Nel mondo, il principale cancerogeno epatico contenuto nei cibi è l'aflatossina, un prodotto del metabolismo del fungo *Aspergillus flavus* che contamina i cibi (in genere le derrate di cereali immagazzinate in climi caldi ed umidi) in molti paesi tropicali, in particolare nell'Africa Meridionale e nel Sud-Est Asiatico. Sperimentalmente, è tra i più potenti carcinogeni epatici conosciuti per alcune specie animali ed è verosimile che lo sia anche per l'uomo. Inoltre, l'incidenza di epatocarcinomi primitivi in alcune zone dell'Africa australe (dove questo tumore è particolarmente diffuso) è positivamente correlata con il contenuto di aflatossina nella dieta.



Epatocarcinoma ben differenziato: spazi portalì assenti, epatociti istologicamente poco diversi dal normale, aggregati in cordoni molto ampi e in tubuli.



Epatocarcinoma poco differenziato: epatociti anaplastici aggregati in masse prive di struttura

TRATTAMENTO DELL'EPATOCARCINOMA

Chirurgia

Nei casi operabili, la chirurgia è il solo trattamento che offre speranza di guarigione completa. La chirurgia può essere utilizzata solo quando il tumore è localizzato e la funzionalità del tessuto epatico circostante non è compromessa. Trova indicazione nei casi di epatocarcinoma monofocale di dimensioni inferiori a 5 cm.

Il trapianto di fegato

Ove disponibile, il trapianto di fegato da donatore non vivente può essere impiegato, con risultati soddisfacenti, in pazienti con HCC di dimensioni inferiori a 5 cm e con meno di tre noduli. Il trapianto può essere eseguito anche in pazienti cirrotici con compromissione della funzionalità epatica, anche se non esistono raccomandazioni riguardo l'estensione di questi criteri. I pazienti vengono inseriti nelle liste d'attesa in base a un punteggio che dipende dalle caratteristiche del tumore: i candidati favoriti sono quelli con HCC solitario di piccole dimensioni (< 2 cm) e quelli con HCC di 2-5 cm o tre noduli ciascuno di non più di 3 cm.

La chemioembolizzazione

Qualora il tumore non possa essere asportato chirurgicamente o non c'è possibilità di trapianto, il trattamento d'elezione è la chemioembolizzazione. Questa tecnica consiste nell'infusione di farmaci chemioterapici (che uccidono le cellule tumorali), legati a sferette di materiale inerte, nell'arteria epatica. Infatti, i

tumori del fegato sono irrorati dai rami dell'arteria epatica, mentre il tessuto epatico sano è nutrito da un altro vaso, la vena porta. Proprio per questo, l'iniezione selettiva dei farmaci nei rami dell'arteria epatica può determinare la formazione di un embolo o di un'occlusione nei soli vasi che irrorano il tumore, limitando la tossicità per il tessuto sano. I risultati ottenuti con la chemioembolizzazione sono buoni: si è osservata una riduzione significativa della massa tumorale nel 40-50 per cento dei casi; inoltre la metà dei pazienti trattati sopravvive più di un anno dal trattamento.

L'alcolizzazione percutanea e la termoablazione

Quando il tumore può essere asportato ma il paziente non è operabile, si possono usare due tecniche alternative: l'alcolizzazione percutanea e la termoablazione. Queste tecniche prevedono la distruzione del tumore mediante iniezione di alcol o calore, portati dentro al fegato con aghi o sonde introdotte attraverso la parete addominale sotto guida ecografica. L'alcol diffonde selettivamente nel tumore, causando la morte delle cellule cancerose per denaturazione; il calore, prodotto da una radiazione con lunghezza d'onda di poco inferiore a quella degli infrarossi (radiofrequenza), produce un effetto simile. Pazienti candidabili all'alcolizzazione percutanea sono quelli con una lesione inferiore a 5 cm (preferibilmente < 3 cm), non operabili, con adeguata funzione epatica e senza metastasi. La termoablazione può essere applicata in caso di tumore non resecabile e può essere effettuata oltre che per via percutanea anche chirurgicamente. Per i tumori di dimensioni inferiori a 2 cm,

l'alcolizzazione e la termoablazione sono ugualmente efficaci, mentre per tumori di dimensioni superiori è preferibile la termoablazione.

Il vantaggio principale della termoablazione è che può essere effettuata in un'unica seduta. D'altra parte la sua applicazione è limitata dalle difficoltà tecniche di raggiungere sedi anatomiche difficili o molto distanti.

Antracicline

Le antracicline sono farmaci antitumorali appartenenti alla categoria degli antibiotici citotossici, ovvero un gruppo di farmaci, isolati per lo più da fonti naturali, la cui azione antineoplastica è dovuta ad interazione con il DNA, con conseguente introduzione di danni all'acido nucleico che innescano l'apoptosi (Kratz F, 2006). Sono molto efficaci ma anche molto tossici dal momento che non sempre riescono a discriminare tra le cellule maligne e le sane. I primi derivati antraciclinici ad essere scoperti ed utilizzati in terapia, sono stati la daunorubicina (o daunomicina) e la doxorubicina (o adriamicina) che, nei primi anni '60, vennero isolati da ceppi di *Streptomyces peucetius*. La daunorubicina è attualmente commercializzata con i nomi di Daunoblastina e Daunoxome, mentre la doxorubicina come Adriblastina, Caelyx e Myocet.

Dal punto di vista strutturale, gli antibiotici antraciclinici sono caratterizzati da una porzione tetraciclica planare, legata glicosidicamente ad un amminozucchero (daunosamina). Le strutture molecolari della daunorubicina e della doxorubicina differiscono solamente per uno dei sostituenti terminali.

Seppure piccola, tale differenza strutturale ha importanti conseguenze sullo spettro di attività dei due antibiotici citotossici. La doxorubicina, infatti, ha applicazioni cliniche di rilievo soprattutto nei tumori solidi (carcinoma mammario, dell'endometrio, delle ovaie, dei testicoli, della tiroide, dei polmoni), mentre la principale indicazione clinica della daunorubicina è la leucemia acuta (Ewens A, 2006; Tallman MS, 2007). Altri derivati antraciclinici utilizzati sono epirubicina e idarubicina.

L'epirubicina è un derivato semisintetico della doxorubicina, ottenuto tramite epimerizzazione da assiale ad equatoriale del gruppo idrossilico al C4' della daunosamina; tale modificazione fa diminuire l'emivita del farmaco.

L'idarubicina deriva dalla daunorubicina per eliminazione del gruppo metossilico al C4; tale antraciclina ha uno spettro d'attività più ampio rispetto alla daunorubicina e ciò potrebbe essere attribuito alla maggiore lipofilità.

L'idarubicina può inoltre essere somministrata per via orale e gli studi in vitro hanno indicato che essa potrebbe essere più efficace della daunorubicina nei casi di MDR (Multi Drug Resistance).

Mentre in passato si riteneva che il meccanismo con cui le antracicline esplicano la loro attività citotossica fosse dovuto alla sola intercalazione di tali molecole nella struttura del DNA, con conseguente inibizione delle normali attività dell'acido nucleico, attualmente la tendenza è quella di ritenere l'intercalazione sì necessaria ma non sufficiente all'azione antitumorale.

Risultati recenti hanno infatti indicato nella topoisomerasi II eucariotica un bersaglio dell'azione citotossica delle antracicline. Ciò è stato dimostrato usando ceppi di lievito mutati nell'espressione della topoisomerasi II che risultavano resistenti alle antracicline.

Le topoisomerasi sono enzimi nucleari che rilassano il DNA superavvolto attraverso tagli reversibili o ad un singolo filamento del duplex, come fa la topoisomerasi I, o ad entrambi, come fa invece la topoisomerasi II. In entrambi i casi l'elica viene reversibilmente interrotta attraverso la formazione, in modo ATP-dipendente, di un legame fosfodiesterico tra l'OH della tirosina dell'enzima (Tyr⁸⁰⁵ nella topoisomerasi umana) e il gruppo fosforico del DNA. Il taglio consente all'estremità libera dell'acido nucleico di ruotare, risolvendo il superavvolgimento. A questo punto l'OH dell'estremità libera del DNA può ripristinare la continuità dell'elica attaccando il fosfato attivato.

Attualmente si sa che le antracicline, dopo essersi intercalate nella doppia elica, vanno a localizzarsi all'interfaccia tra il sito attivo della topoisomerasi II e il sito di cleavage del DNA, interagendo pertanto sia con l'uno che con l'altro e ricoprendo una regione di quattro coppie di basi che vanno dalla posizione -2 alla +2 rispetto al legame fosfodiesterico tagliato. La loro azione si esplica stabilizzando un complesso di cleavage detto ternario perché formato dal DNA, dall'enzima e dal farmaco, in cui le eliche del DNA sono tagliate e legate all'enzima. Pertanto l'azione del farmaco porta a tagli irreversibili nel DNA che aprono la strada al programma di morte cellulare nelle cellule tumorali. In tal

modo le antracicline, trasformando una proteina utile in una tossina che “avvelena” irreversibilmente il DNA, sono anche definite “veleni” della topoisomerasi II per distinguerle dagli inibitori veri e propri dell’enzima come il dexrazosano che inibisce a monte l’intero ciclo catalitico. Una peculiarità dei veleni è che la loro azione mostra una netta specificità di sequenza e pertanto veleni chimicamente simili stimolano cleavage agli stessi siti del DNA. Per esempio la doxorubicina, la daunorubicina e l’idarubicina richiedono necessariamente un’adenina in posizione -1 e una timina in posizione -2.

Marcatori biologici dell’epatocarcinoma

Il marcatore tumorale caratteristico per l'HCC è l'alfafetoproteina (AFP). L'AFP è prodotta anche durante il periodo fetale ma diminuisce stabilmente e diviene normale dai 6 ai 12 mesi di età. Questa sostanza è prodotta dai pazienti con epatocarcinoma o tumori a cellule germinali. La percentuale di pazienti con HCC che presenta valori elevati di AFP è estremamente variabile nei vari studi (30-90%) e i pazienti con epatocarcinoma possono avere livelli che vanno da valori appena sopra il normale (più di 14 ug/ml) fino a 1.000.000 ug/ml. Bisogna tuttavia ricordare come un modesto aumento dei valori dell'AFP può avvenire anche in pazienti con malattie non tumorali come la cirrosi o le epatiti virali. Come il CEA, AFP è usata per monitorare l'efficacia del trattamento del tumore nei pazienti con epatocarcinoma e tumori delle cellule germinali. Livelli aumentati di questi marcatori sono associati con la crescita tumorale, ma l'assenza di una elevazione non può essere interpretata come assenza di tumore.

I GENI NOTCH

I geni Notch sono stati scoperti nella *Drosophila melanogaster* e devono il loro nome alla particolare struttura ad intaglio dell'ala della *Drosophila* stessa. Gli studi condotti nella mosca dimostrarono un loro coinvolgimento in diversi processi cellulari tra cui la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e il mantenimento della staminalità cellulare, da qui l'interesse per tali geni negli organismi superiori. Nell'uomo i geni Notch codificano per quattro recettori trans-membrana: Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 caratterizzati da una elevata omologia di struttura. I recettori Notch sono eterodimeri la cui porzione extracellulare è costituita da una serie di EGF repeats e da un dominio LNR (Lin Notch Repeats) probabilmente coinvolto nelle modifiche post-traduzionali. La porzione intracellulare definita NICD (Notch Intracellular Domain) risulta costituita da diversi domini tra cui i più importanti sono il dominio RAM che interagisce con il fattore di trascrizione CBF1 e il dominio PEST che conferisce stabilità proteica e media l'ubiquitinazione e la successiva degradazione della proteina ad opera del proteasoma. La formazione dell'eterodimero si forma nel trans-golgi ad opera di una secretasi di tipo alfa (convertasi furinica o ADAM) il cui taglio promuove la formazione della proteina matura costituita da due subunità tenute insieme da un legame non covalente.

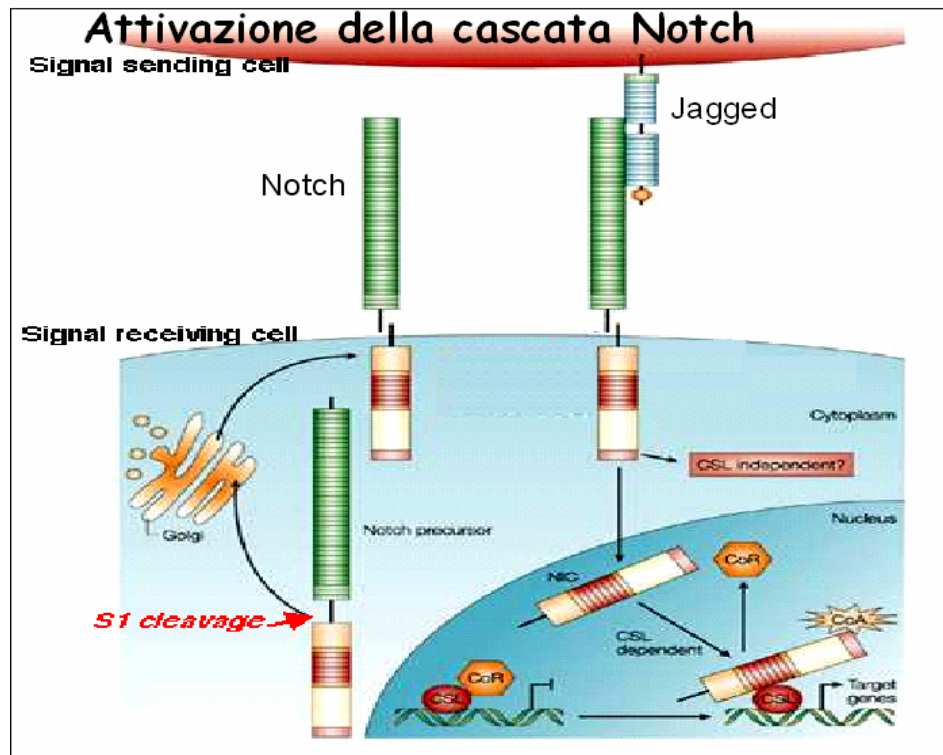
Attivazione dei Recettori Notch

L'attivazione dei recettori Notch è operata da ligandi, anch'essi proteine di membrana, appartenenti alla famiglia Delta e Serrate. Alla prima classe appartengono i ligandi Delta1, 3 e 4 mentre alla seconda Jagged1 e 2 (Gray GE, 1999; Yoneya T, 2001).

L'interazione ligando recettore innesca una cascata di eventi proteolitici operati da enzimi diversi. La processazione è la stessa per tutti i recettori Notch, ciò che varia è la localizzazione dei siti di taglio e di conseguenza la dimensione del frammento risultante. Il primo taglio avviene 12-13aa a monte della regione trans-membrana, è operato dalla TACE (TNF-convertase enzyme) e origina il frammento NEXT (Notch extracellular truncation) che viene successivamente tagliato da una gamma secretasi e si origina il frammento NICD. Siti alternativi possono essere presenti nella regione EGF e portano alla formazione di recettori tronchi costitutivamente attivi. Il dominio intracellulare risultante dalla processazione proteolitica può subire diversi destini (Aguilar RC, 2003).

Il NICD può migrare nel nucleo attraverso le importine ed interagire con il complesso CBF1 che media la trascrizione dei geni target tra cui geni appartenenti alle famiglie HES ed HERP (Iso T, 2003). L'affinità del NICD per CBF1 sembra determinata da modificazioni post-traduzionali quali glicosilazioni e fosforilazioni (Foltz DR, 2001).

Alternativamente il NICD viene ubiquitinato dal complesso E2-E3 ligasi che determina le modificazioni conformazionali necessarie a promuovere l'esposizione di *death sites* riconosciuti dal proteasoma citosolico.



I geni Notch nei tumori umani

Alterazioni a carico dei recettori Notch sembrano coinvolti nello sviluppo di diverse neoplasie umane. In letteratura ci sono studi che riportano che la costitutiva attivazione del notch pathway gioca un ruolo centrale nello sviluppo di alcuni tumori attraverso il blocco del differenziamento cellulare (Harper JA, 2003). Studi di attività del Notch 1 nella linfopoiesi dell'adulto hanno evidenziato il ruolo selettivo del notch pathway nel processo di sviluppo preferenziale dei linfociti T (Harper JA, 2003).

La traslocazione cromosomiale (7;9)(q34;q34.3) del gene Notch 1 è responsabile di una serie di leucemie linfoblastiche: questa aberrazione cromosomica determina la sintesi del recettore Notch1 privo della regione extracellulare, e quindi costitutivamente attivato. Signaling notch sovraregolati sono stati identificati nei tumori della cervice, soprattutto in pazienti portatori di HPV: studi in vitro riportano interazioni tra le proteine virali E6/E7 ed il Notch. Inoltre altri studi hanno riportato che l'ablazione del Notch 1 nell'epidermide dell'adulto determina l'inibizione della crescita e differenziamento dei cheratinociti. Tali evidenze sperimentali indicano che il notch pathway è interessato nei processi di differenziamento cellulare in tutti quei tessuti che vanno incontro alla rigenerazione tissutale (Harper JA, 2003).

Un signaling notch aberrante può determinare nel pancreas la metaplasia dell'epitelio duttale, una lesione precancerosa pancreatica (Harper JA, 2003).

Studi approfonditi hanno evidenziato l'interazione tra gli effettori della cascata notch ed alcuni fattori di crescita come il TGF α ed EGF nell'induzione tumorale pancreatica. Una over-espressione dei recettori Notch3 e 4 è stata riscontrata nel melanoma maligno (Nickoloff BJ, 2003) nel tumore del pancreas (Miyamoto Y, 2003) e della mammella (Hu C, 2006). Notch1 risulta attivo durante la rigenerazione epatica e la sua over-espressione inibisce la crescita dell'epatocarcinoma umano in vitro e in vivo (Qi R, 2003)

Il meccanismo alla base della tumorigenesi notch dipendente sembra essere correlato con l'alterazione dello stato cellulare ovvero con il mantenimento della cellula in uno stadio non differenziato e altamente proliferativo.

Notch3 e CADASIL

Con l'acronimo CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*), si identifica una forma di demenza vascolare a trasmissione ereditaria autosomica dominante con esordio nell'età adulta, caratterizzata da infarti cerebrali nella sostanza bianca, che provocano paralisi pseudobulbare e demenza di tipo subcorticale. Il gene-malattia Notch3, localizzato sul cromosoma 19, codifica per una proteina transmembrana di 2321 aminoacidi, coinvolta nella trasduzione del segnale e nella differenziazione cellulare. Numerose indagini molecolari hanno messo in evidenza che le mutazioni sono localizzate nel dominio che codifica per la porzione extra-citoplasmatica, con forte "clusterizzazione" negli esoni 3 e 4. È oggi noto che l'arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti subcorticali e leucoencefalopatia (CADASIL) è una delle maggiori cause di malattia cerebrovascolare ereditaria (Au KM, 2006).

La conferma certa della diagnosi clinica e strumentale di CADASIL è possibile soltanto geneticamente, mediante la ricerca e dimostrazione di mutazioni nel gene-malattia. Le mutazioni responsabili del CADASIL sono singole mutazioni

missenso, piccole delezioni in frame o mutazioni nei siti di splicing nel gene Notch3 (Oliveri RL, 2001).

Tutte le mutazioni riportate risultano in un numero dispari di cisteine in uno dei 34 domini EGF-*like* nella regione extracellulare amino-terminale del recettore Notch3, che sono codificati dai primi 23 esoni (ad eccezione dell'esone 1). Ciò comporta molto probabilmente modificazioni nel metabolismo di Notch3, conseguenti ad alterazioni di tipo conformazionale. Alcune mutazioni sono piuttosto comuni, essendo circa l'80% di esse transizioni C>T nelle isole CpG. In particolare le mutazioni descritte più frequentemente ricadono negli esoni 3 e 4: infatti è stato riportato che il 50–73% delle famiglie affette da CADASIL presenta mutazioni nell'esone 4, mentre l'8–14% presenta mutazioni nell'esone 3 (Joutel A, 1997).

Notch3 e tumori umani

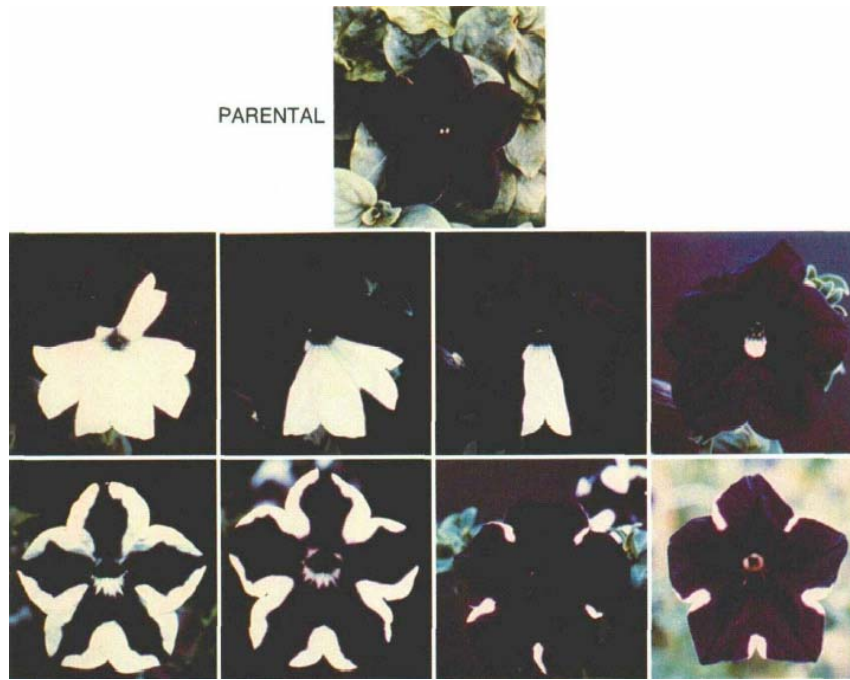
Il recettore Notch3 gioca un ruolo importante nello sviluppo di leucemie (Vacca A, 2006; Campese AF, 2003) nello sviluppo delle neoplasie del polmone (Haruki N, 2005) e nel cancro ovarico dove, peraltro, è stata riscontrata una amplificazione del gene che codifica per il recettore Notch3 (Park JT, 2006). Nonostante gli studi effettuati fino a questo momento abbiano fatto emergere un ruolo importante del recettore Notch3 nello sviluppo di alcune neoplasie umane, le conoscenze sulle funzioni di tale recettore nelle diverse patologie umane e in particolar modo nell'epatocarcinoma sono tuttora molto limitate.

RNA interference

Il silenziamento genico è una tecnica che permette di analizzare le funzioni di un gene, nell'ambito di uno specifico contesto cellulare, inibendone la traduzione.

Inizialmente furono utilizzati frammenti di DNA o RNA antisenso per silenziare geni di interesse, permettendo di studiare gli effetti fenotipici e dedurre così la funzione biologica del gene. Queste tecniche però si dimostrarono non sempre così specifiche e talvolta poco efficienti.

Recentemente è stato evidenziato un nuovo meccanismo di silenziamento genico naturale, mediato da RNA a doppio filamento. In diversi organismi è stato osservato che l'RNA a doppio filamento (dsRNA) è in grado di indurre silenziamento genico sequenza-specifico. Questo processo, chiamato RNA interference (RNAi) è ubiquitario negli animali e nelle piante ed è stato oggetto di intensi studi negli ultimi 10 anni. Nel 1995, il gruppo di ricerca di Jorgensen, nel tentativo di aumentare l'attività del gene della calcone sintasi (un enzima coinvolto nella produzione di specifici pigmenti), introdusse dei transgeni in petunia. Inaspettatamente la pigmentazione non aumentò, anzi si ebbe una variegazione del colore e, in alcuni casi, la totale perdita di colore.



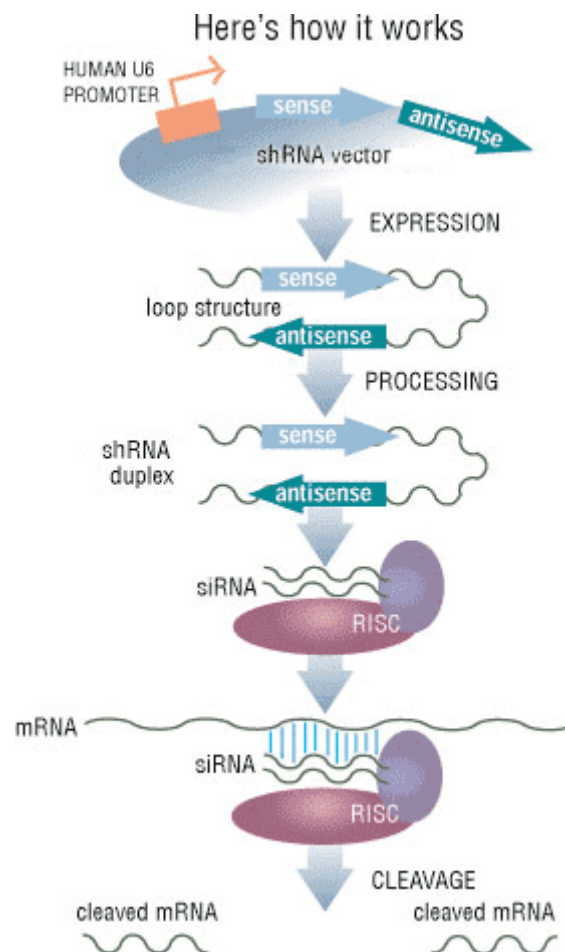
Scoperta dell'RNA interference nella Petunia

Questo fenomeno fu definito “co-soppressione”, intendendo la soppressione sia del gene introdotto, sia quello endogeno. In seguito, la “co-soppressione” venne ricondotta al PTGS (post transcriptional gene silencing) poiché, in tutti i casi, il fenomeno era il risultato di una degradazione dell'RNA trascritto. Inoltre, questa degradazione post-trascrizionale era osservata anche per transgeni espressi da piante, batteri o sequenze virali. Mentre si parlava di PTGS in piante, un fenomeno molto simile denominato “quelling” (repressione) era già stato osservato nei funghi (Pandit NN, 1992; Romano N, 1992). Nel 1996, Cogoni et al., nel tentativo di incrementare la produzione di un pigmento arancione trasformarono una coltura di *Neurospora crassa* con un plasmide contenente un segmento del gene *al1* ottenendo come risultato fenotipi albini. Nel 1998 Fire et

al. catalogarono questi fenomeni isolati sotto un principio comune: l'RNA interference (RNAi).

Meccanismo base dell'RNA interference

Il modello funzionale dell'RNAi consta di due fasi fondamentali: quella di "iniziazione" e quella "effettrice". Nella fase iniziale, i dsRNA immessi nella cellula (in maniera diretta, attraverso transgene o virus) vengono "digeriti" in corte molecole di dsRNA chiamate siRNA (small interfering RNAs), lunghe da 21 a 23 paia di basi. Dati sperimentali provano che i siRNA vengono prodotti dall'enzima Dicer (una ribonucleasi bidentata), un membro della super famiglia delle RNasi III, (dsRNA specifiche ribonucleasi), il quale taglia i dsRNA attraverso una reazione ATP dipendente. Successive rielaborazioni degradano i siRNA a duplex di 19-21 bp con un prolungamento di due nucleotidi al 3'. Nella fase effettrice, i duplex siRNA si legano ad un complesso nucleasico e formano quello che viene chiamato "RNA-induced silencing complex": RISC. Dopo tale legame, i siRNA vanno incontro ad una denaturazione a singolo filamento (reazione ATP-dipendente), necessaria per l'attivazione del complesso RISC. Il complesso così attivato, usando come stampo il singolo filamento incorporato, va a tagliare filamenti di mRNA complementari allo stesso.



RNAi in cellule di mammifero

In cellule di mammifero sono state riscontrate molte più difficoltà nell'indurre l'RNAi. Questo perché a seguito dell'introduzione di dsRNA, spesso a rispondere non è un sistema di silenziamento sequenza-specifico, ma un sistema che inibisce tutta l'espressione globalmente. In questi casi ad interagire con il dsRNA, introdotto in cellule di mammifero, è una proteina kinasica (DAI o PKR) che va a scatenare la risposta immunitaria dell'interferone bloccando globalmente la trascrizione. Utilizzando invece i siRNA, i quali non azionano la

risposta interferonica, si è riusciti ad indurre il silenziamento sequenza-specifico. Questa scoperta, come descritto in seguito, si mostrerà utile al fine di poter progettare metodologie di somministrazione umana a scopo terapeutico.

Progettare i siRNA

Le metodologie con cui viene progettato un siRNA sintetico sono un aspetto molto importante della ricerca per ottenere risultati accettabili nelle prove di silenziamento. Nel disegno di un siRNA funzionale vi sono parametri di base che devono essere considerati. La regione target deve essere a valle del codone di inizio traduzione ad una distanza che varia dalle 50 alle 100 bp; l'mRNA target deve avere al 5' una sequenza AA(N19)UU, possedere un contenuto di GC del 50% circa, sono da evitare le regione ricche di G (Elbashir SM, 2001). Ad oggi molte ditte private offrono un servizio personalizzato di sintesi di siRNA; alcune di esse sono Dharmacon, Quiagen, Ambion, MWG). Vickers nel 2003 ha sviluppato un metodo per ottenere una migliore efficienza nella degradazione dell'mRNA bersaglio. Questo consiste nel disegnare siRNA che sia complementari a siti notoriamente sensibili all'attività dell'RNAsi H. Inoltre, recenti test hanno dimostrato che in molti casi sono più efficienti siRNA di 27 bp rispetto ai classici di 20-22 bp. Ciò probabilmente favorisce una migliore incorporazione nel complesso RISC, dal momento che queste molecole possono essere ancora tagliate da Dicer. Con il crescente interesse rivolto a queste nuove metodologie di silenziamento genico, sono stati sviluppati appositi software che attraverso algoritmi specifici, generano i migliori siRNA possibili, applicabili ad

un determinato mRNA target. Lapotenzialità di questi software, abbinata alla possibilità di allineare, attraverso BLAST, tutte le possibili sequenze presenti nelle banche dati, permette di trovare con notevole facilità tutti i possibili target per la costruzione di un siRNA. Possono così essere individuati geni che potrebbero essere silenziati collateralmente o possibili altri bersagli in diversi organismi.

Come descritto in precedenza, i semplici siRNA, in alcuni casi, non sono in grado di generare un silenziamento. Questo può essere dovuto al fatto che essi, non essendo naturalmente processati dall'enzima Dicer, possono non integrarsi correttamente nel meccanismo. Le molecole più semplici sono piccoli RNA sintetizzati chimicamente (siRNA); una volta introdotti nell'organismo non devono essere processati dall'enzima Dicer in quanto emulano già un suo possibile prodotto, e vengono direttamente incorporati nel complesso RISC, guidando la degradazione dell'mRNA. Lunghi dsRNA devono invece essere processati da Dicer per generare diversi siRNA. Vengono anche sintetizzati shRNA, duplex di RNA a forcina, con perfetta complementarietà dei bracci; anch'essi, tagliati da Dicer, generano siRNA funzionali.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro è stato valutare l'espressione dei recettori Notch nell'epatocarcinoma umano, nella cirrosi epatica, nell'epatite cronica e nel fegato sano per stabilire quale fra i recettori Notch potrebbe essere maggiormente coinvolto nello sviluppo neoplastico. I risultati ottenuti hanno mostrato come il Notch3 sia l'unico recettore ad essere espresso nel tessuto neoplastico ma non nel tessuto epatico circostante. Per analizzare un possibile ruolo di Notch3 nella proliferazione cellulare e nella resistenza al chemioterapico doxorubicina il gene Notch3 è stato silenziato nella linea tumorale epatica HepG2 mediante infezione con shRNA.

PARTE SPERIMENTALE

Casistica

L'espressione dei recettori Notch è stata valutata su 20 campioni di epatocarcinoma umano e nel tessuto circostante la neoplasia. Dopo resezione epatica i campioni sono stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina per la valutazione istopatologica. I tumori analizzati erano di grado diverso, rispettivamente: G1 (1), G2 (5), G3 (12), G4 (2). Nove casi erano HCV positivi, cinque HBV positivi, quattro positivi per entrambi i virus mentre nessuna infezione è stata riscontrata nei rimanenti due casi.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica che permette la visualizzazione di antigeni cellulari basandosi sulla immunoreattività di anticorpi e sulla loro visualizzazione diretta o indiretta. La sensibilità dell'immunoistochimica viene aumentata utilizzando tecniche indirette che constano di due passaggi distinti: un anticorpo secondario marcato con un complesso enzimatico reagisce con l'anticorpo primario che ha legato l'antigene cellulare permettendone la visualizzazione. Per le nostre indagini è stato utilizzato il sistema Envision (Dako, Denmark), HRP costituito da un anticorpo secondario coniugato ad una lunga catena di polidestrano a cui sono legate numerose perossidasi.

Da ogni blocchetto paraffinato sono state tagliate delle sezioni di 4µm di spessore, raccolte su vetrini silanati (3-aminopropiltriethoxysilano) per evitarne il distacco durante lo smascheramento antigenico. Le sezioni sono state processate per l'indagine immunoistochimica nel modo seguente: sparaffinatura

in due cambi di toluene (2 passaggi da 15 minuti ciascuno), 2 passaggi in etanolo 100 da 2 minuti, inibizione delle perossidasi endogene (metanolo + H₂O₂ al 1%) a 4°C per 20 minuti. Le sezioni sono state quindi idratate nella scala decrescente degli alcoli fino all'acqua. L'utilizzo dei preparati fissati in formalina ha reso necessario uno smascheramento dei siti antigenici prima dell'incubazione con l'anticorpo primario in forno a microonde con tampone citrato PH 6.00 10mM. L'incubazione con gli anticorpi primari per i quattro recettori Notch è stata fatta a 4 °C overnight (ON) utilizzando le seguenti diluizioni: Notch1 (Ab8925, Abcam) 1:600, Notch2 (Santa Cruz, CA) 1:200, Notch3 (SantaCruz) 1:300, Notch4 (SantaCruz) 1:400. Dopo opportuni lavaggi in PBS le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario (EnVision, Dako), 30 minuti RT. Lo sviluppo finale, che permette di valutare la reazione antigene-anticorpo è stato fatto utilizzando come cromogeno la Diamminobenzidina (DAB). Un millilitro di DAB al 5% è stata diluita in 50 ml di tampone Tris Azide Imidazolo (TAI) PH 7.6 , 49 ml di DDW e 10µl di H₂O₂ al 30%. Le perossidasi legate all'anticorpo secondario, in presenza di perossido di idrogeno, catalizzano l'ossidazione della DAB dando un precipitato marrone ben visibile. Le sezioni sono state contrastate in ematossilina, disidratate nella scala crescente degli alcoli e montate in DPX (BDH Chemical, Poole, UK).

Colture cellulari

La linea HepG2 (ATCC), coltivata in MEM arricchito con 10% FBS, 1% glutammica e 1% streptomicina, è stata utilizzata nel presente studio.

RNA Interference

La tecnica dell'RNA interference è una tecnica estremamente innovativa che permette di bloccare l'espressione di una proteina di interesse andando a bloccare l'RNA messaggero che la codifica mediante oligonucleotidi sintetici. Gli oligonucleotidi sono piccoli frammenti di DNA (19-21 paia di basi) complementari ad una regione dell'RNA di interesse. Una volta avvenuto l'appaiamento il complesso formatosi (RNA-Oligo) viene degradato, ad opera di un enzima cellulare chiamato Dicer, impedendo così la formazione della proteina. Sono stati disegnati tre diversi shRNA (short hairpin RNA) per Notch1 e per Notch3, inseriti nel vettore retrovirale pSuper.puro (OligoEngine, Seattle, WA). Per generare i retrovirus di interesse il vettore pSuper.puro, contenente i shRNA di interesse, è stato trasfettato nelle cellule packaging Phoenix A . I virus ottenuti sono stati utilizzati per infettare le cellule HepG2. Gli shRNAs disegnati sono risultati in grado di inibire l'espressione proteica di Notch1 e di Notch3. Come controllo negativo è stato utilizzato un retrovirus codificante per uno shRNA complementare al gene della luciferasi (GL2)

Trasfezione di small interfering RNA con lipofectamina

Le lipofectamine sono una classe di molecole formate da una coda policationica a cui si lega il DNA e da una porzione lipidica che facilita il passaggio del complesso DNA-lipofectamina attraverso la membrana cellulare. Ventiquattro ore prima della trasfezione le cellule infettate con N3 shRNA e con GL2 sono state piastrate in multi well da 6 pozzetti in MEM privo di antibiotici. Una volta raggiunta la confluenza del 40% le cellule sono state trasfettate con 40nM di p53 siRNA validati o con degli scramble siRNA (Invitrogen) secondo il protocollo della lipofectamina. Cinque ore dopo la trasfezione il terreno è stato sostituito con del MEM completo. L'efficienza di trasfezione, valutata transfettando un siRNA marcato con fluoresceina, è risultata del 90% sia a 48 ore che a 72 ore dopo la transfezione. Le cellule sono state raccolte a 48 ore e a 72 ore dalla trasfezione per analizzare l'espressione di p53 mediante western blot o sottoposte al trattamento con doxorubicina per 24 ore. La vitalità cellulare è stata successivamente valutata con il trypan blue.

Analisi del ciclo cellulare

Cinque giorni dopo l'infezione con N3 shRNAs sono state raccolte un milione di cellule, lavate in PBS e fissate in alcol 70% a -20°C. Successivamente le cellule sono state risospese in PBS contenete 50ug di propidio e 100ug/ml di RNase A per 30 minuti a 37°C. I campioni sono stati successivamente analizzati al FACS Aria (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Trattamento con doxorubicina

Le cellule infettate con N3 shRNA sono state sottoposte ad un trattamento con 100ug/ML di doxorubicina per 1, 3, 6, 12, 18 e 24 ore mentre le cellule infettate con N1 shRNA sono state trattate con doxorubicina solamente per 24 ore. Ricordiamo che la doxorubicina è uno dei farmaci maggiormente utilizzati per la terapia locoregionale dell'epatocarcinoma. Successivamente sono stati valutati i seguenti parametri: morte cellulare mediante colorazione con trypan blue, apoptosi mediante western blot per la forma clivata della proteina PARP, frammentazione del DNA mediante comet assay e la capacità delle cellule di incorporare la doxorubicina mediante citofluorimetria.

RT-PCR

La retrotrascrizione è stata fatta utilizzando 2µg di RNA, estratto con RNeasy (Invitrogen, Scotland, UK) seguendo il protocollo dello stesso in 30µl di 1X RT Buffer, 0.4mM dNTP, 5mMDTT, 0.5µM OligodT, 3µM Random Primers, 240U Superscript II (Invitrogen, Scotland, UK). La reazione di retrotrascrizione è stata condotta a 42°C per 1 ora, seguita da 5 minuti a 95°C per inattivare la retrotrascriptasi. Il cDNA dei diversi estratti cellulari è stato normalizzato con la PCR per il gene della β -actina. I cicli utilizzati per l'amplificazione della β -actina sono stati 25 così caratterizzati: un ciclo iniziale a 94°C per 4 minuti, denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 30 minuti. Con l'eccezione della temperatura di annealing

e del numero di cicli, questi parametri sono stati gli stessi per ogni set di primers utilizzati. I prodotti della PCR sono stati caricati in un gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio e quantificati con analisi fluorimetrica (Quantity One, Biorad).

Estrazione proteica

Dopo la tripsinizzazione le cellule sono state raccolte in falcon da 15ml e centrifugate a 1800 rpm a 4°C. Il surnatante costituito da terreno di coltura è stato scartato e le cellule sono state risospese in PBS freddo, trasferite in eppendorf da 2ml e nuovamente centrifugate. Il surnatante è stato scartato e il pellet cellulare è stato omogenizzato in un buffer di lisi costituito da:

10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5mM NaCl, 0.5% Triton X100, 1 mM DTT, e da una mix di inibitori delle proteasi). I lisati cellulari sono stati incubati in ghiaccio per 30 min, centrifugati a 13000 rpm e il surnatante trasferito in una nuova provetta. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di lowry.

Western Blot

50 ug di ogni estratto proteico sono stati incubati a 95°C per 10 minuti con aggiunta di 2X sample buffer contenente: 65mM Tris-HCl, pH 7.5, 65mM 2-mercaptoetanolo, 1% SDS, 10% glicerolo e 0.003% blu di bromofenolo e caricati in un gel di poliacrilamide contenente SDS. Al termine della corsa elettroforetica i gel sono stati blottati su membrane di nitrocellulosa.

Successivamente le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con 5% di latte scremato in PBS per la copertura dei siti aspecifici e quindi incubate con i seguenti anticorpi:

Anticorpo I	Ditta	Diluizione	Incubazione
BetaActina	Clone AC-40 Sigma	1:1000	1h /RT
P21	Clone SX118, DAKO,Denmark	1:100	O.N. 4°C
Gadd45a	AB3863, Chemicon	1:300	3h /RT
Notch3	sc-5593, Santa Cruz Biot	1:300	3h /RT
Kip1/P27	Clone 57, BD Biosciences	1:2000	1h/RT
Cleaved PARP	9546, Cell Signaling	1:100	O.N. 4°C
P53	Clone DO-7, Dako	1:500	1h/RT
p-P53	sc-18079-R, Santa Cruz Biot	1:100	O.N. 4°C
Notch1	ab8925, Abcam	1:100	O.N 4°C

Dopo ripetuti lavaggi le membrane sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi (EnVision, DAKO) per 40 min a temperatura ambiente. Lo sviluppo è stato fatto con ECL e il segnale visualizzato mediante autoradiografia.

Comet Assay

Il “single cell gel electrophoresis” (SCGE), meglio conosciuto come Comet assay, è una tecnica rapida, semplice e sensibile utilizzata per la valutazione del danno al DNA in ogni singola cellula. Mediante la versione alcalina del comet assay proposta da Singh (1988) è possibile individuare diverse tipologie di danno al DNA quali: rottura del doppio filamento di DNA; presenza di addotti al DNA che in ambiente basico determinano la rottura del filamento di DNA; meccanismi di riparazione per escissione; rottura di una singola catena di DNA, siti alcalino-labili e funzionamento/non funzionamento degli enzimi di riparazione.

A livello sperimentale vengono preparati i vetrini con cellule incluse in agarosio che restano in una soluzione di lisi per un'ora a quattro gradi. I vetrini vengono poi posizionati all'interno di una cella elettroforetica per 25' in una soluzione fortemente alcalina. Il buffer alcalino determina denaturazione del DNA. I vetrini vengono successivamente sottoposti ad una corrente di 300mA per 25minuti, incubati in una soluzione neutralizzante, contrastati con bromuro di etidio e disidratati. Per la valutazione dei risultati ci si avvale di un microscopio a fluorescenza collegato ad una telecamera. Una volta acquisite le immagini, il danno al DNA viene calcolato come percentuale di fluorescenza nella coda rispetto al nucleo utilizzando il programma per l'analisi di immagine CASP.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma di analisi statistica StatView. I risultati sono rappresentati come la media di due esperimenti indipendenti + l'errore standard (S.E.) La significatività dei risultati è stata valutata utilizzando il test di Student. Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Notch3 è iper-espresso nell'epatocarcinoma umano

In questo studio abbiamo analizzato l'espressione dei recettori Notch1, Notch3 e Notch4 nell'epatocarcinoma umano (HCC) e nel tessuto circostante. Nessuno dei recettori analizzati è espresso nel fegato sano o nell'epatite cronica mentre non abbiamo riscontrato differenze nell'espressione dei recettori Notch1 e Notch4 fra cirrosi e HCC. Il recettore Notch3, invece, è espresso nel 75% degli HCC analizzati (15/20) mentre i campioni cirrotici non esprimono il recettore (Figura 1). Non è stata riscontrata nessuna relazione tra espressione di Notch3, grado del tumore e infezione virale. Non è stato possibile valutare l'espressione del recettore Notch2 in quanto gli anticorpi disponibili in commercio causano un forte background che non permette una corretta valutazione dell'espressione dello stesso.

I nostri risultati suggeriscono che il Notch3 può essere importante per la sopravvivenza e/o la progressione dell'epatocarcinoma. Per valutare possibili funzioni svolte dal Notch3 nell'epatocarcinoma e verificare se tale recettore può essere un buon target per il trattamento dell'HCC, abbiamo utilizzato una linea cellulare di HCC che esprime alti livelli di Notch3 (Giovannini C, 2006).

Effetto del Notch3 shRNA sulla crescita cellulare.

Per determinare se il Notch3 può essere un buon target terapeutico nel trattamento dell'epatocarcinoma abbiamo valutato l'effetto della deplezione di

Notch3 (shRNA) sulla crescita cellulare e sulla risposta alla doxorubicina.

L'efficienza del silenziamento è stata determinata mediante western blot ed è risultata del 70% con entrambi gli interference utilizzati. La deplezione del Notch3 non altera il ciclo cellulare valutato una settimana dopo l'infezione.

Effetto di Notch3 shRNA nella regolazione dell'espressione genica e proteica

In risposta alla riduzione dei livelli di Notch3 si è osservata una riduzione nell'espressione genica di HES1, un target diretto di Notch, una up-regolazione del messaggero di p53 e, sorprendentemente una down-regolazione del gene WAF1, target diretto di p53 (Figura 2A). Per trovare una possibile spiegazione al fatto che Notch3 non altera il ciclo cellulare abbiamo analizzato l'espressione di proteine responsabili della regolazione del ciclo cellulare quali: p21, p27, Gadd45a (Figura 2B). Paragonando le cellule prive di Notch3 con il controllo negativo si osserva una diminuzione dei livelli di p21 (4 volte), un aumento nell'espressione di p27 (2.3 volte) e un aumento nell'espressione di Gadd45 (2 volte). Inoltre nelle cellule infettate con Notch3 shRNA si osserva un aumento di p53 (5 volte) e di p-P53 (3.2) volte.

Notch3 knock-down aumenta la sensibilità alla doxorubicina favorendo la morte per apoptosi.

I recettori Notch sembrano coinvolti, sulla base dei loro livelli di espressione e del contesto cellulare, nel conferire resistenza alla morte cellulare per apoptosi

(Leong KG, 2006). In questo studio abbiamo analizzato se Notch3 conferisce resistenza alla doxorubicina nelle cellule HeG2. La vitalità cellulare è stata valutata mediante trypan blue. La morte cellulare nelle cellule infettate con N3 shRNA aumenta di tre volte e di due volte dopo rispettivamente 24 ore e 6 ore di trattamento con doxorubicina rispetto al controllo negativo (Figura 3A). Il trattamento con doxorubicina determina morte cellulare per apoptosi come indicato dalla determinazione del frammento a 89KDa (Figura 3B) corrispondente alla forma olivata della proteina PARP (19).

Comet assay

Il comet assay viene normalmente utilizzato per misurare il danno al DNA indotto da agenti diversi. In questo saggio il DNA danneggiato, durante la corsa elettroforetica, si allontana dal nucleo di DNA intatto formando una coda. Il danno basale dei controlli GL2 e delle cellule silenziate Notch3 risulta lo stesso ($P=0,6686$). Il danno al DNA è stato valutato dopo il trattamento con doxorubicina per 1h, 3h, 6h, 12h, 18h e 24h. Abbiamo osservato un aumento del danno al DNA all'aumentare del tempo di esposizione al farmaco con valori significativamente più elevati nelle cellule silenziate Notch3 (Figura 4B). In queste ultime il danno al DNA dopo 24h di trattamento era talmente elevato che non è stato possibile quantificarlo. L'analisi al FACS ha inoltre dimostrato un maggior uptake di doxorubicina nelle cellule silenziate Notch3 (Figura 4A).

Notch1 knock-down non modifica la sensibilità alla doxorubicina

E' stato dimostrato in studi diversi che alti livelli di p21 conferiscono resistenza alla chemioterapia e alla radioterapia impedendo i processi apoptotici. Sulla base di queste precedenti osservazioni abbiamo analizzato se p21, che risulta down regolata nelle cellule silenziate Notch3 è responsabile dell'aumentata sensibilità alla doxorubicina di queste cellule. Uno studio precedente sull'epatocarcinoma ha dimostrato che una over-espressione di Notch1 inibisce la crescita cellulare attraverso una up-regolazione di p21. In accordo con questa osservazione in questo studio abbiamo visto che la deplezione di Notch1 determina una forte diminuzione dei livelli proteici di p21 senza, tuttavia, alterare la sensibilità alla doxorubicina. (Figura 2C). Nelle cellule silenziate Notch1 i livelli di p53 e di p-P53 non venivano modificati.

P53 siRNA riduce la sensibilità alla doxorubicina nelle cellule silenziate Notch3

Allo scopo di verificare un possibile coinvolgimento della up-regolazione della p53 nell'aumentata sensibilità alla doxorubicina abbiamo silenziato, in modo transiente, la p53 mediante siRNA validati. La p53 risultava fortemente diminuita 48h dopo la trasfezione e assente 72h dopo la trasfezione (Figura 2). Le cellule trasfettate sono state successivamente trattate con 100ug/ml di doxorubicina per 24h e la morte è stata successivamente valutata mediante trpan blue. Come mostrato nella figura 5 la morte risultava del 40% nelle cellule silenziate paragonata al 75% nelle cellule trasfettate con il siRNA scramble

(Figura 5). La deplezione di p53 non modifica la morte cellulare nelle cellule infettate con il controllo negativo shRNA GL2 suggerendo che alti livelli di Notch3 impediscono alla p53 endogena di indurre apoptosi massiva dopo trattamento con doxorubicina.

DISCUSSIONE

L'epatocarcinoma è la neoplasia maligna del fegato maggiormente diffusa, ogni anno vengono diagnosticati un milione di nuovi casi con HCC e, ad oggi, l'incidenza è pressoché sovrapponibile alla mortalità. La bassa sopravvivenza dei pazienti con HCC è legata al fatto che la malattia è spesso diagnosticata in fase avanzata (non resecabile), i donatori per eventuale trapianto di fegato sono pochi, e l'epatocarcinoma è molto resistente alla chemioterapia. Infatti la doxorubicina, farmaco maggiormente utilizzato per la terapia dell'epatocarcinoma, determina una risposta parziale solo nel 10% dei casi. I meccanismi molecolari coinvolti nella resistenza dell'epatocarcinoma agli agenti terapeutici sono ad oggi sconosciuti.

Il Notch signaling pathway gioca un ruolo importante nel mantenere un equilibrio fra proliferazione cellulare, differenziamento e apoptosi. Alterazioni del Notch signaling pathway sono state descritte in diverse neoplasie umane e il loro ruolo sembra essere tumore dipendente. In questo studio abbiamo visto una elevata espressione del recettore Notch3 nell'epatocarcinoma mentre la cirrosi, l'epatite cronica e il fegato sano non esprimono tale recettore suggerendo un ruolo importante del Notch3 nello sviluppo dell'HCC. Per supportare questa ipotesi abbiamo analizzato il ruolo del recettore Notch3 nella proliferazione cellulare e nella resistenza alla doxorubicina in vitro. La down regolazione di Notch3 non determina alterazioni del ciclo cellulare, valutato cinque giorni dopo l'infezione, nonostante abbiamo osservato una down regolazione della p21 una

up regolazione di p27 e di Gadd45a. Possiamo supporre che gli effetti sul ciclo cellulare causati dalla diminuzione di p21 potrebbero essere compensati dall'aumento di p27 e Gadd45a entrambi importanti nella regolazione della proliferazione cellulare. Notch3 non sembra, pertanto, contribuire alla proliferazione dell'epatocarcinoma in questo contesto. Visto che la proteina p21 è principalmente regolata da p53 abbiamo analizzato l'espressione della stessa in termini di mRNA e di proteina nelle cellule infettate. Le cellule silenziate Notch3 up regolano la p53 sia a livello di messaggero che di proteina in concomitanza ad una up regolazione della forma attiva di p53 (p-p53). I bassi livelli di p21 osservati nonostante gli alti livelli di p53 può essere spiegata dalla riduzione dei livelli del gene target di Notch, HES1. HES1 è coinvolto nella regolazione dell'espressione di p21 legandosi direttamente al promotore di WAF1. Il silenziamento di Notch3 aumenta di tre volte l'apoptosi indotta dal trattamento con la doxorubicina. L'uptake della doxorubicina, la frammentazione del DNA e l'apoptosi sono stati analizzati dopo ogni singolo esperimento. Tutti i parametri analizzati aumentavano significativamente nelle cellule silenziate Notch3. L'aumentata risposta alla doxorubicina osservata nelle cellule silenziate Notch3 è probabilmente riferibile a livelli più alti di p53 e p-p53 osservati. Per verificare tale ipotesi le cellule infettate sono state trasfettate con p53 siRNA e il risultato ottenuto ha dimostrato che solo in assenza di Notch3 p53 gioca un ruolo importante nella risposta alla doxorubicina. L'apoptosi osservata nelle cellule silenziate Notch3 dopo trattamento con

doxorubicina risulta, per la maggior parte, p53 dipendente e in parte p53 indipendente. Studi precedenti su cellule neoplastiche di melanoma hanno dimostrato come l'apoptosi p53 indipendente possa essere indotta dall'attivazione della proteina NOXA. Un meccanismo simile potrebbe esistere nelle HepG2. I nostri risultati mostrano come una costitutiva up-regolazione di p-p53 favorisca l'apoptosi in seguito a danno al DNA causato dalla doxorubicina.

I nostri risultati suggeriscono che Notch3 è, almeno in parte, un effettore positivo della multi-drug resistance impedendo l'attivazione di meccanismi apoptotici p53 dipendenti ed indipendenti. L'elevata espressione di Notch3 riscontrata negli epatocarcinoma suggerisce che Notch3 sia un recettore importante per lo sviluppo dell'HCC. Inoltre, considerando che il fegato non neoplastico, sia esso normale, cirrotico o affetto da epatite cronica, non esprime Notch3, il trattamento dell'epatocarcinoma con Notch3 siRNA potrebbe favorire la risposta alla doxorubicina senza causare alterazioni molecolari e funzionali al fegato circostante il nodulo neoplastico.

APPENDICE

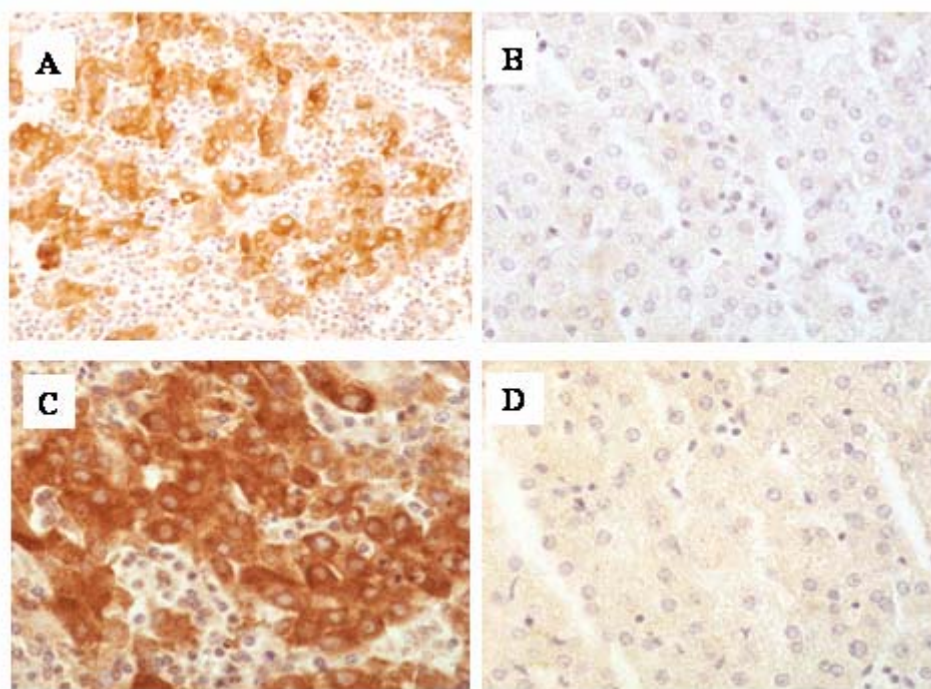


Figura 1. Espressione del Notch3 nell'epatocarcinoma e tessuto circostante.

Sezioni fissate in formalina ed incluse in paraffina di HCC e tessuto circostante sono state utilizzate per valutare l'espressione del recettore Notch3. La positività è stata valutata con un sistema HRP Envision e la diaminobenzidina come cromogeno. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina. L'immagine è rappresentativa dell'espressione del Notch3 nell'epatocarcinoma (A, C) e del tessuto non neoplastico circostante il nodulo di HCC.

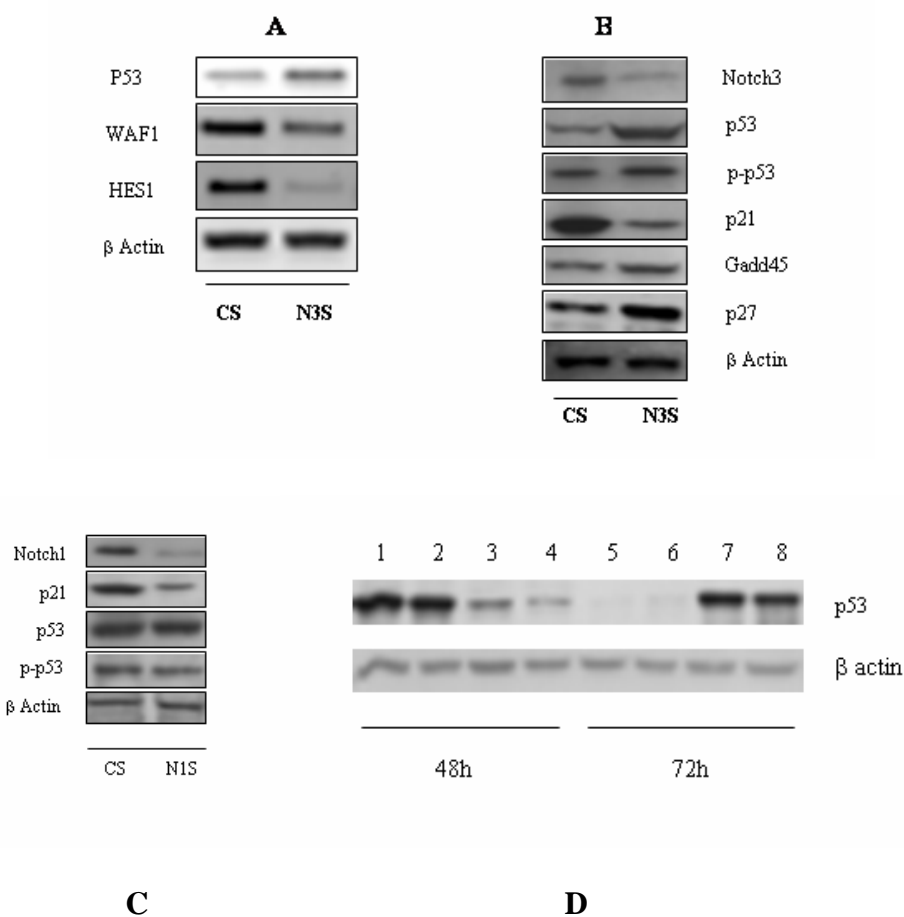


Figura 2. Espressione genica e proteica nella linea cellulare HepG2 infettata con shRNA

(A). Espressione genica mediante RT-PCR di p53, WAF1 e HES1. (B) Western blots di Notch3, p53, p-p53, p21, Gadd45a, p27. L'analisi densitometrica mostra una diminuzione di 5 volte dei livelli di p21 e un'amentata espressione proteica di p27 (2.3 volte), Gadd45a (2 volte), p53 (5 volte) e p-p53 (3.2 volte). CS: controllo negativo GL2, N3S: Notch3 shRNA. (C) Espressione proteica mediante western blot di p21, p53 e p-p53 nelle cellule silenziate Notch1, N1S: Notch1 shRNA. (D) p53 short interference RNA. La linea cellulare HepG2 precedentemente infettata con Notch3 e GL2 shRNA è stata trasfettata con 40nM di siRNA per p53 o con 40nM di siRNA controllo negativo. La down regolazione di p53 è stata valutata mediante western blot 48h e 72h dopo la trasfezione. scRNA: scrambled RNA. 1,7: N3S/scRNA; 2,8: CS/scRNA; 3,5: N3S/p53 siRNA; 4,6: CS/p53 siRNA. La beta actina è stata utilizzata come controllo interno per i livelli proteici e per l'espressione genica.

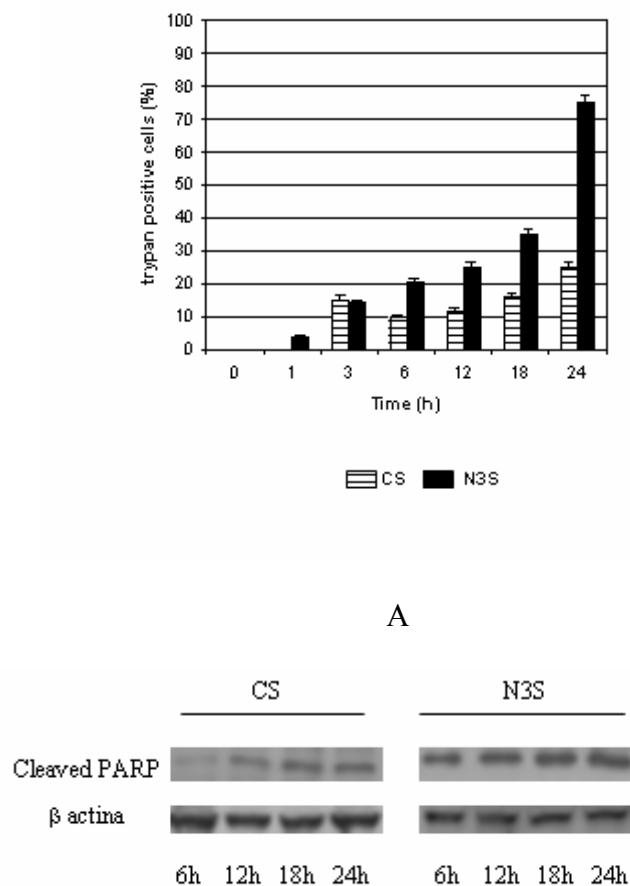


Figura 3. Vitalità cellulare e apoptosi

(A) Le cellule infettate sono state trattate con 100ug/ml di doxorubicina per i tempi indicati e la morte cellulare valutata con trypan blue contando 200 cellule per campione. Le colonne rappresentano la media di due esperimenti indipendenti e le barre l'errore standard.

(B) Le cellule infettate e trattate con 100ug/ml di doxorubicina sono state raccolte e lisate e l'apoptosi è stata valutata mediante western blot utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per il PARP clivato. CS: shRNA GL2 controllo negativo, N3S: Notch3 shRNA.

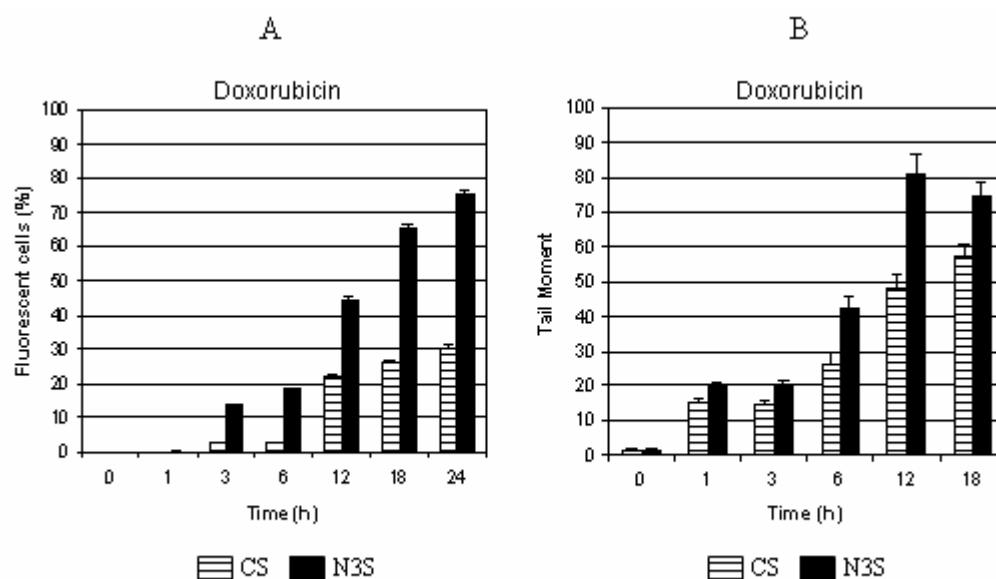


Figura 4. Analisi dell'uptake della doxorubicina e del danno al DNA.

(A) Valutazione dell'uptake della doxorubicina mediante analisi al FACS. Le cellule silenziate Notch3 incorporano più doxorubicina rispetto ai controlli già dopo tre ore di trattamento.

(B) Danno al DNA valutato mediante comet assay. Le cellule infettate sono state trattate con doxorubicina (100ug/ml) per i tempi indicati. Il danno basale al DNA (senza trattamento con doxorubicina) è risultato uguale sia nelle cellule silenziate Notch3 che nei controlli negativi ($P=0.66$) mentre aumenta in maniera significativa nelle cellule Notch3 KO dopo trattamento con doxorubicina. Le colonne rappresentano la media di due esperimenti indipendenti e le barre l'errore standard. CS: shRNA GL2 controllo negativo, N3S: Notch3 shRNA.

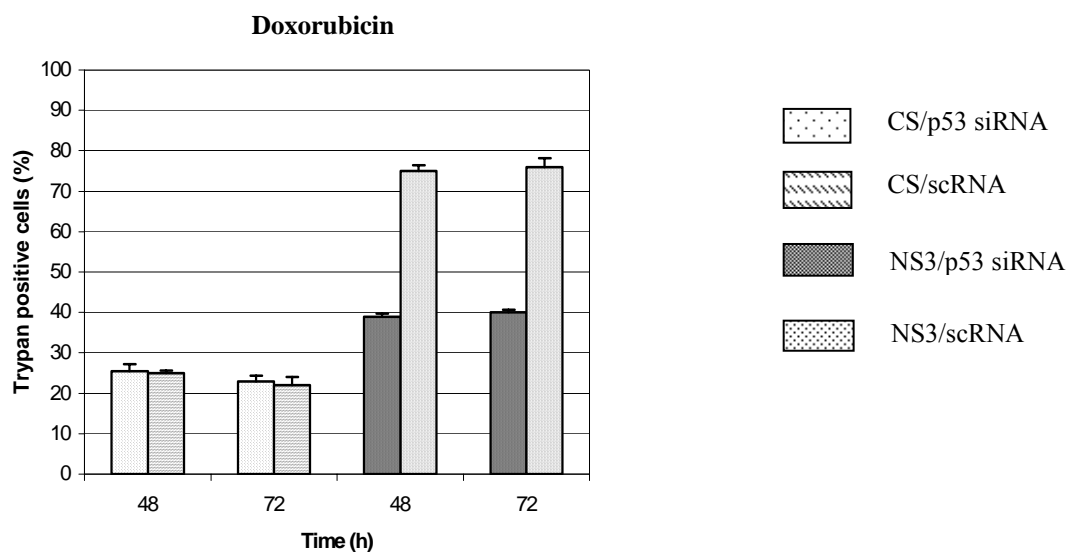


Figura 5. P53 siRNA riduce la sensibilità delle cellule silenziate Notch3 alla doxorubicina.

Quarantotto ore e settantadue ore dopo la trasfezione con p53 siRNA o con un siRNA di controllo le cellule sono state trattate con 100ug/ml di doxorubicina per 24h. La vitalità cellulare è stata valutata mediante trypan blue contando almeno 200 cellule per campione. Le colonne rappresentano la media di due esperimenti indipendenti e le barre l'errore standard.

CS: GL2 negative control shRNA, N3S; Notch3 shRNA; scRNA: scrambled RNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Aquilar RC, Wendland B. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15: 184-190, 2003.
2. Au KM, Li HL, Sheng B, Chow TC, Chen ML, Chan AY. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Hum Genet.* 119:677, 2006.
3. Campese AF, Bellavia D, Gulino A, Screpanti I. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *Semin Cell Dev Biol* 14: 151-7, 2003.
4. Cogoni C, Irelan JT, Schumache, M, Schmidhauser T, Selker EU, and Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by acytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 15: 3153-3163, 1996.
5. Elbashir, SM, Harborth J, Weber K, and Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199-213, 2001b.
6. Ewens A, Luo L, Berleth E, Alderfer J, Wollman R, Hafeez BB, Kanter P, Mihich E, Ehrke MJ. Doxorubicin plus interleukin-2 chemoimmunotherapy against breast cancer in mice. *Cancer Res* 66:5419-26, 2006.
7. Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* Dec 21, 2006.

8. Fire A, Albertson D, Harrison S & Moerman D. Production of antisenseRNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113: 503–514, 1991.
9. Foltz DR, Nye JS. Hyperphosphorylation and association with RBP of the intracellular domain of Notch1. *286*: 484-492, 2001.
10. Giovannini C, Lacchini M, Gramantieri L, Chieco P, Bolondi L. Notch3 intracellular domain accumulates in HepG2 cell line. *Anticancer Res* 26: 2123-2127, 2006.
11. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, et al. Human ligands of the Notch Receptor. *Am J Pathol* 154:785-794, 1999.
12. Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Visan I, Guidos CJ. Notch signaling in development and diseases. *Clin Genet* 64: 461-472, 2003.
13. Hu C, Dievart A, Lupien M, Calvo E, Tremblay G, Jolicoeur P. Overexpression of activated murine Notch1 and Notch3 in transgenic mice blocks mammary gland development and induces mammary tumors. *Am. J. Pathol* 168: 973-990, 2006.
14. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237-55, 2003.
15. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C et al (1997) Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 350:1511–1515, 2003.

- 16.Kratz F, Warnecke A, Schmid B, Chung DE, Gitzel M. Prodrugs of anthracyclines in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem.* 13:477-523, 2006
- 17.Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107: 2223-33, 2006.
- 18.Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 13: 74-81, 2007.
- 19.Michielsen PP, Francque SM, van Dongen JL. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol.* 20:3-27, 2005
- 20.Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3: 565-576, 2003.
- 21.Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 29: 6598-6608, 2003.
- 22.O'Brien MA, Moravec RA, Riss TL. Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *Biotechniques* 2001; 30: 886-891.
- 23.Oliveri RL, Muglia M, De Stefano N et al (2001) A novel mutation in the Notch3 gene in an Italian family with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: genetic and magnetic resonance spectroscopic findings. *Arch Neurol* 58:1418–1422, 2003.

24. Pandit, NN and Russo VEA. Reversible inactivation of foreign gene, *hph*, during asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. *Mol Gen Genet.* 234, 412-422, 1992.
25. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, Kurman RJ, Eberhart CG, Shih IeM, Wang TL. Notch3 amplification in ovarian cancer. *Cancer Res* 66: 6312-8, 2006.
26. Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T and Cao X: Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 63: 8323-8329, 2003.
27. Romano, N., and Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343-3353, 1992.
28. Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* 80: 4372-9, 2006.
29. Suriawinata AA, Thung SN. Malignant liver tumor. *Clinical liver diseases* 6: 527-54, 2002.
30. Tallman MS. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20:57-65, 2007.
31. Vacca A, Felli MP, Palermo R, et al. Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *EMBO J.* 25:1000-8, 2006. Haruki N, Kawaguchi KS, Eichenberger S, Massion PP,

Olson S, Gonzalez A, Carbone DP, Dang TP. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* 65:3555-61, 2005.

32. Yoneya T, Tahara T, Nagao K, Yamada Y, Yamamoto T, Osawa M, et al. Molecular cloning of delta-4, a new mouse and human Notch ligand. *J. Biochem.* 129: 27-34, 2001